

低氧致大鼠凝血功能异常对肺组织结构的改变及 灯盏花素对其的拮抗作用*

黄建戈, 谢敏[△], 张旭, 何秋颖, 何高燕

四川大学华西医院 呼吸内科(成都 610041)

【摘要】 目的 研究不同低氧时间作用下大鼠肺组织中纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)、活化蛋白酶C(APC)表达量及肺组织结构的变化及灯盏花素对上述改变的影响。**方法** 选取80只SD大鼠,将其随机分为:A(常氧对照)组、B(单纯低氧)组、C(低氧+低剂量灯盏花素)组、D(低氧+高剂量灯盏花素)组。各低氧组每天置于常压性低氧(101 kPa、10% O₂)环境中处理8 h,低剂量及高剂量灯盏花素组分别给予腹腔注射10 mg/kg 体质量、40 mg/kg 体质量的灯盏花素。于实验第3、7、14、21 d 每组随机处死5只大鼠,HE染色观察肺组织病理改变,RT-PCR检测转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、PAI-1的mRNA表达量,Western blot法检测PAI-1蛋白的表达量,ELISA法检测肺泡灌洗液(BALF)中APC蛋白的表达量。**结果** ①HE染色提示3~21 d低氧环境下肺泡间隔有不同程度增厚。3~21 d,B组大鼠肺组织中TGF- β 1、PAI-1的mRNA表达量及PAI-1蛋白表达量均较A组增高($P<0.05$),BALF中APC蛋白的表达量较A组降低($P<0.05$),且随着低氧时间延长,上述变化越显著。PAI-1 mRNA与TGF- β 1表达水平呈正相关($r=0.913, P<0.05$)。②与B组比较,C、D组21 d时肺泡间隔增厚程度减轻,TGF- β 1、PAI-1的mRNA表达量及PAI-1蛋白表达量降低($P<0.05$),BALF中APC蛋白的表达量增加($P<0.05$),且D组变化较C组明显($P<0.05$)。**结论** 低氧可能造成凝血功能异常,使凝血活性增高,纤溶活性及抗凝活性降低,上调PAI-1水平及下调APC水平致肺泡间隔增厚,其机制可能与TGF- β 1信号通路有关。而灯盏花素可以改善低氧所致的高凝状态,减轻肺泡间隔增厚。

【关键词】 低氧 肺纤维化 血液凝固 灯盏花素

Hypoxemia Induced the Changing Structure of the Lung Tissue in SD Rat Though Changing Blood Clotting and the Effects of Breviscapine's Intervention HUANG Jian-ge, XIE Min[△], ZHANG Xu, HE Qiu-ying, HE Gao-yan.
Department of Respiratory, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: Xieminhuaxi@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the expressions of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), activated protein C (APC) and the histology structures of the rat lung tissues in the different hypoxia time; and to investigate the effects of breviscapine to the above changes. **Methods** Eighty SD rats were randomly divided into A (control), B (hypoxia), C (hypoxia+low-dose breviscapine) and D (hypoxia+high-dose breviscapine) groups with 20 rats in each group. Each hypoxia group placed daily pressure (101 kpa, 10% O₂) environment for 8 h, low-dose and high-dose breviscapine groups were given of 10 mg/kg, 40 mg/kg breviscapine by intraperitoneal injection. On the 3rd, 7th, 14th and 21st d, 5 rats were randomly taken from each group and were killed for examination. The hematoxylin and eosin stain (HE stain) was performed for observation on pathological changes in the rat lung tissues. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis was performed for detection of the mRNA levels of transforming growth factor (TGF- β 1) and Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). Western blot analysis was applied for detection of the expression of PAI-1. Besides, APC in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was determined by ELISA. **Results** ① The HE stain demonstrated that compared with A group, the degree of thickening of alveolar septal the mRNA expressions of TGF- β 1 and PAI-1, and the protein expressions of PAI-1 in B group were increased ($P<0.05$), and the expression of APC in the BALF was decreased ($P<0.05$). And with prolonged hypoxia, the more significant of these changes were observed. Positive correlation was found between the mRNA levels of PAI-1 and TGF- β 1 ($r=0.936, P<0.05$). ② Compared with B group, the increased thicknesses of alveolar septal in C and D groups were lightened, the mRNA expressions of TGF- β 1 and PAI-1, and the protein expression of PAI-1 were decreased ($P<0.05$), and the expressions of APC in the BALF was increased ($P<$

* 四川省科技厅攻关项目(No. 0040205301469)资助

[△] 通讯作者, E-mail: Xieminhuaxi@163.com

0.05)。With increasing dose, the expression levels of each factor gradually reduced or increased. **Conclusion** Hypoxia may cause coagulant function abnormality to increase clotting activity and reduce fibrinolytic activity and the anticoagulant activity, inducing alveolar septal thickening, and the mechanism of above changes may related to the TGF- β 1 signaling pathways. Breviscapine could improve hypoxia-induced hypercoagulable state that alleviate alveolar septal thickening.

【Key words】 Hypoxia Pulmonary fibrosis Blood coagulation Breviscapine

肺纤维化是各种不同病因导致的以肺成纤维细胞异常增殖及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积为主要病理学特征的一种弥漫性肺疾病,其发病机制仍未阐明,过去认为其可能主要与肺泡上皮细胞损伤及免疫复合物在肺间质沉积有关,但糖皮质激素及免疫抑制剂治疗效果不佳。近年来有许多研究及文献报道^[1-3],凝血系统的异常变化参与了其过程。低氧是一重要的病理过程,可致血液凝血活性增强,纤溶活性及抗凝活性降低,引起血液的高凝状态。灯盏花素具有改善微循环等作用,在心脑血管疾病中已应用多年。我们课题组前期已从体内、体外研究证实低氧环境下可通过多种信号通道致人肺成纤维细胞及大鼠肺组织 I 型胶原表达增多,致 ECM 过度沉积,促进肺纤维化的形成^[4,5]。本实验以大鼠为研究对象,观察不同低氧时间中,大鼠肺组织中凝血酶原激活物抑制物(PAI-1)、活化蛋白酶 C(APC)的表达,肺组织结构的变化及灯盏花素对上述表达及变化的影响,从凝血系统病理生理改变出发,探讨致低氧致肺纤维化的另一分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级健康雄性大鼠,购于湖南斯莱克景达动物有限公司。PAI-1(兔抗大鼠多克隆抗体)购自美国 Abcam 公司, β -actin 抗体购自北京博赛森生物公司,APC ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程公司,PAI-1、TGF- β 1 引物由 Invitrogen 公司合成,RT-PCR 试剂盒购自宝生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备及肺组织标本留取 选取 80 只体重 200~250 g 的健康雄性 SPF 级 SD 大鼠为研究对象,将其随机平均分为:A(对照组)、B(单纯低氧)组、C(低氧+低剂量灯盏花素)组、D(低氧+高剂量灯盏花素)组。对照组大鼠饲养于常氧(101 kPa、21%O₂)环境中;各低氧组每天置于常压性低氧(101 kPa、10%O₂)环境中低氧处理 8 h。对

照组及单纯低氧组于每天低氧干预前 0.5 h 腹腔注射等体积生理盐水,低剂量及高剂量灯盏花素组分别给予腹腔注射 10 mg/kg 体质量、40 mg/kg 体质量的灯盏花素,每日 1 次。以首次注射日为第 1 d,于第 3、7、14、21 d 每组随机处死 5 只大鼠,向左肺注入 4℃ 预冷的生理盐水 1 mL 后抽取肺泡灌洗液(BALF);右肺中叶组织用 10% 中性甲醛(体积分数)固定后石蜡包埋,行 HE 染色。剩余的双肺肺叶组织及所得的 BALF 上清液保存于 -80℃ 冰箱,待行 RT-PCR、Western blot、ELISA 检测。于 3、7、14 d 检测 A、B 组指标,观察缺氧对大鼠肺组织的影响;于 21 d 检测所有组指标,观察不同剂量灯盏花素对缺氧的拮抗作用。

1.2.2 HE 染色观察肺组织形态学改变 右肺组织脱蜡水化后,行 HE 染色。显微镜下观察大鼠肺组织肺泡间隔变化。

1.2.3 RT-PCR 法检测大鼠肺组织中 TGF- β 1、PAI-1 mRNA 表达量 TGF- β 1 引物:sense 5'-GGCCA GATCCTGTCCAAACT-3', antisense 5'-CACGA TTACCACCTGGCGTT-3',扩增片段长度:300 bp;PAI-1 引物:sense 5'-CGTCTTCCT CCACAGCCATT-3', antisense 5'-TGCCGAAC CACAAAG AGAAAG-3',扩增片段长度 90 bp;内参为 β -actin。用 Trizol 法提取 RNA,按试剂盒说明书反转录,扩增,PCR 反应程序为:先 94℃ 变性 2 min,后 94℃ 变性 30 s,59℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共扩增 28 个循环。用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并进行图像分析,以 PAI-1、TGF- β 1 与 β -actin 电泳条带光密度(OD)值的比值表示 PAI-1、TGF- β 1 mRNA 的相对表达量。

1.2.4 Western blot 法检测大鼠肺组织中 PAI-1 蛋白表达量 取冻存的肺组织(100 mg)于冰上剪成碎片,加入 500 μ L 组织裂解液及蛋白酶抑制剂,提取蛋白,定量、分装,保存在 -80℃ 冰箱中备用。用 BCA 法测定蛋白浓度。在蛋白质样品中按 5:1 体积比加入蛋白变性缓冲液于加热仪上 100℃ 加热 10 min 使蛋白质变性。配制适量的 Tris-甘氨酸-

SDS 聚丙烯酰胺凝胶,转膜,封闭后分别孵一抗 (PAI-1、 β -actin 抗体 1 : 1 000 稀释),4 ℃ 冰箱中过夜。一抗孵育结束后用 TBST 缓冲液洗膜,每次 5 min,共 3 次,分别孵育二抗(1 : 10 000 稀释)各 1 h。二抗孵育结束后用 TBST 缓冲液洗膜,每次 5 min,共 3 次,显影、定影、曝光。用计算机图像分析,以 PAI-1 与 β -actin 的 OD 值的比值表示 PAI-1 蛋白相对表达量。

1.2.5 ELISA 法检测大鼠 BALF 中 APC 蛋白表达量 按照 ELISA 试剂盒(武汉华美)说明书步骤进行,分别测定各组 BALF 中 APC 的表达,每个样品设 3 个复孔。并按其说明建立标准曲线,根据样品 OD 值在标准曲线上查出相应浓度,再根据其稀释倍数计算出样品试剂浓度。

1.3 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较用方差分析,两两比较用 S-N-K 法,相关性分析采用 Pearson

直线相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肺组织形态学改变

HE 染色切片显示,A 组肺组织结构未见明显充血水肿,肺泡间隔正常,见图 1;B 组第 3 d 肺泡间隔就出现轻度增厚,随着低氧时间延长,肺泡间隔增厚越明显,14 d、21 d 肺泡间隔增厚逐渐加重,见图 2。

2.2 单纯低氧对大鼠肺组织中各因子表达的影响

2.2.1 大鼠肺组织中 PAI-1 mRNA、TGF- β 1 mRNA 表达的变化 RT-PCR 检测结果显示 A 组大鼠肺组织中各时间点 PAI-1、TGF- β 1 mRNA 表达量均无明显变化($P > 0.05$),而 B 组大鼠肺组织中 3~21 d PAI-1、TGF- β 1 mRNA 表达量均较 A 组增高($P < 0.05$),随低氧时间延长,其表达量逐渐上调($P < 0.05$),且 PAI-1 mRNA 表达与 TGF- β 1 表达水平呈正相关($r = 0.913, P < 0.05$),见表 1。

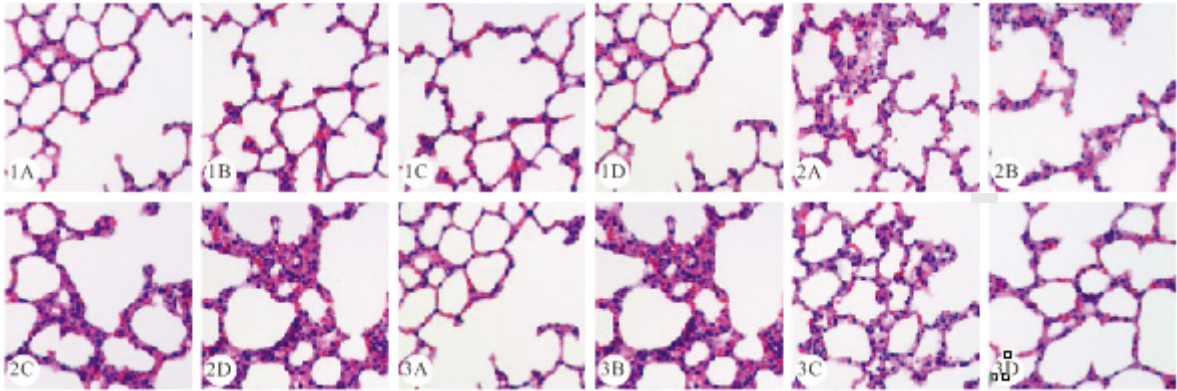


图 1 A 组各时点肺组织病理学改变。HE $\times 200$ 图 2 B 组各时点肺组织病理学改变。HE $\times 200$ 图 3 第 21 d 各组肺组织病理学改变。HE $\times 200$

Fig 1 The pulmonary pathological of A group at different time points. HE $\times 200$ Fig 2 The pulmonary pathological of B group at different time points. HE $\times 200$ Fig 3 The pulmonary pathological of each group at 21 d. HE $\times 200$

1A, 2A; 3 d; 1B,2B; 7 d; 1C,2C; 14 d; 1D,2D; 21 d; 3A: A group; 3B: B group; 3C: C group; 3D: D group

2.2.2 大鼠肺组织中 PAI-1 蛋白表达及 BLAF 中 APC 蛋白表达的变化 Western blot 检测结果(表 2)显示,各时点大鼠肺组织中 B 组 PAI-1 蛋白表达

均较 A 组高($P < 0.05$),且随着低氧时间延长,上述变化越显著。ELISA 结果(表 2)显示,BALF 中 B 组 APC 蛋白表达第 3 d 均较 A 组表达量差异无统

表 1 常氧对照组及单纯低氧组各时点大鼠肺组织 PAI-1 及 TGF- β 1 mRNA 的表达($n=5$)				
Table 1 The expression of PAI-1 and TGF- β 1 mRNA in lung tissue of different groups ($n=5$)				
	PAI-1 mRNA		TGF- β 1 mRNA	
	A group	B group	A group	B group
3 d	0.468 $\pm$ 0.045 [#]	0.553 $\pm$ 0.049	0.814 $\pm$ 0.046 [#]	1.218 $\pm$ 0.127
7 d	0.464 $\pm$ 0.040 [#]	0.780 $\pm$ 0.035 [▲]	0.860 $\pm$ 0.026 [#]	1.537 $\pm$ 0.182 [▲]
14 d	0.524 $\pm$ 0.050 [#]	0.927 $\pm$ 0.062 ^{▲,△}	0.819 $\pm$ 0.032 [#]	1.788 $\pm$ 0.083 ^{▲,△}
21 d	0.518 $\pm$ 0.048 [#]	1.406 $\pm$ 0.132 ^{▲,△,*}	0.833 $\pm$ 0.039 [#]	2.002 $\pm$ 0.100 ^{▲,△,*}
[#] $P < 0.05$, vs. B group; [▲] $P < 0.01$, vs. 3 d in the same group; [△] $P < 0.05$, vs. 7 d in the same group; * $P < 0.05$, vs. 14 d in the same group				

计学意义($P>0.05$),但后期随着低氧时间延长其表达量逐渐降低($P<0.05$),与 A 组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 灯盏花素对低氧 21 d 各因子表达的影响

HE 染色显示,与 B 组比较,C、D 组药物干预后肺泡间隔增厚程度减轻,且 D 组减轻更明显,见图 3。C、D 组第 21 d 大鼠肺组织中 *PAI-1* mRNA、

TGF-β1 mRNA 表达及 *PAI-1* 蛋白表达较 B 组有所降低,且 D 组较 C 组显著($P<0.05$),见表 3、表 4、图 4、图 5。第 21 d 时 C、D 组 BALF 中 APC 蛋白表达较 B 组增加,且 D 组较 C 组增加显著。但 C、D 组与 A 组比较,肺泡间隔仍有增厚,*PAI-1* mRNA、*TGF-β1* mRNA 表达及 *PAI-1* 蛋白表达仍上调,APC 蛋白表达仍下调($P<0.05$)。

表 2 对照常氧组及单纯低氧组各时点大鼠肺组织中 PAI-1 蛋白及 BLAF 中 APC 蛋白表达(n=5)

	PAI-1 protein		APC protein	
	A group	B group	A group	B group
3 d	0.388±0.032 [#]	0.698±0.021	0.735±0.015	0.734±0.036
7 d	0.374±0.012 [#]	1.036±0.015 [▲]	0.685±0.014 [#]	0.575±0.023 [▲]
14 d	0.407±0.019 [#]	1.246±0.020 ^{▲·△}	0.757±0.007 [#]	0.429±0.019 ^{▲·△}
21 d	0.386±0.024 [#]	1.525±0.056 ^{▲·△·*}	0.752±0.015 [#]	0.274±0.016 ^{▲·△·*}

[#] $P<0.05$, vs. B group; [▲] $P<0.01$, vs. 3 d in the same group; [△] $P<0.05$, vs. 7 d in the same group; ^{*} $P<0.05$, vs. 14 d in the same group

表 3 低氧 21 d 各组大鼠肺组织 PAI-1 mRNA 及 TGF-β1 mRNA 的表达 (n=5)

Table 3 The expression of PAI-1 and TGF-β1 mRNA of each group at 21 d in lung tissue (n=5)

	A group	B group	C group	D group
PAI-1 mRNA	0.518±0.048	1.406±0.132 [△]	1.011±0.092 ^{△·▲}	0.648±0.053 ^{△·▲·▼}
TGF-β1 mRNA	0.833±0.039	2.002±0.100 [△]	1.638±0.115 ^{△·▲}	1.398±0.138 ^{△·▲·▼}

[△] $P<0.05$, vs. A group; [▲] $P<0.05$, vs. B group; [▼] $P<0.05$, vs. C group

表 4 低氧第 21 d 各组大鼠肺组织 PAI-1 蛋白表达及 BLAF 中 APC 蛋白表达(n=5)

Table 4 The expression of PAI-1 protein and APC protein of each group at 21 d (n=5)

	A group	B group	C group	D group
PAI-1 protein	0.386±0.024	1.525±0.056 [△]	1.164±0.067 ^{△·▲}	0.774±0.058 ^{△·▲·▼}
APC protein	0.689±0.015	0.274±0.016 [△]	0.413±0.072 ^{△·▲}	0.547±0.050 ^{△·▲·▼}

[△] $P<0.05$, vs. A group; [▲] $P<0.05$, vs. B group; [▼] $P<0.05$, vs. C group

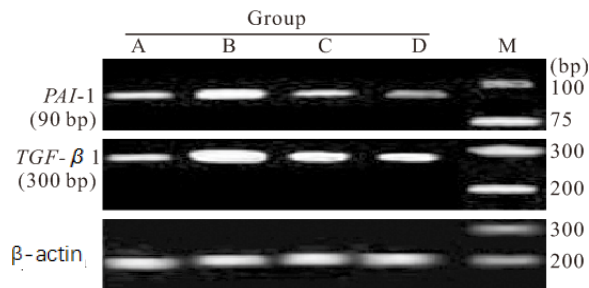


图 4 各组第 21 d 时 PAI-1 mRNA、TGF-β1 mRNA 的表达
Fig 4 RT-PCR assay for PAI-1 and TGF-β1 mRNA of each group at 21 d (M: Marker)

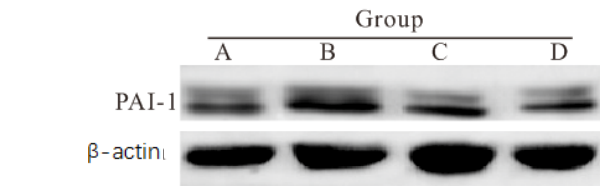


图 5 各组第 21 d 大鼠肺组织 PAI-1 蛋白表达
Fig 5 Western blot assay for PAI-1 protein of each group at 21 d

3 讨论

低氧是临床常见的病理过程,我们课题组前期分别从体内、体外研究证实低氧环境下可通过 RHO/RHO 激酶、TGF-β/Smad、核转录因子(NF-κB/p-p38)等信号通道致细胞、组织水肿,大量炎性细胞浸润及细胞因子〔如结缔组织因子(CTGF)、TGF-β1、低氧诱导因子 α(HIF-1α)、血管内皮生长因子(VEGF)等〕释放,使人肺成纤维细胞及大鼠肺组织 I 型胶原表达增多,致 ECM 过度沉积,促进肺纤维化的形成^[4,5]。而 ECM 降解酶系统主要包括纤溶系统和基质金属蛋白酶(MMPs)系统,我们前期课题也已研究了低氧环境下 MMP1、金属基质蛋白酶组织抑制剂 1(TIMPI)的表达上调致肺成纤维细胞 I 型胶原合成增多^[6],而异常的凝血系统激活及纤溶系统抑制是 ECM 过度沉积的另一重要因素。

本实验以大鼠为研究对象,观察不同低氧时间,大鼠肺组织中 PAI-1、APC 的表达,肺组织结构的变化。PAI-1 是纤溶系统的主要抑制物,其主要通过抑制纤溶酶原激活物(uPA、tPA)的活性,使肺泡腔内大量纤维蛋白无法降解,ECM 沉积促进肺纤维化^[7,8]。APC 是重要的抗凝成分,其对内皮细胞屏障保护作用,并可灭活凝血因子 Va、Ⅷa,抑制 PAI-1,从而打断凝血级联反应,促进纤溶酶的产生及活性增加,减轻机体的高凝状态^[9,10]。Yasui 等^[11]研究表明在小鼠 BLAF 中 APC 增多可以抑制博来霉素诱导的肺纤维化。而 Kimura 等^[12]研究表明低氧可增强 PAI-1 的表达,降低 APC 的活化,从而抑制纤溶系统及抗凝系统。Ueno 等^[13]研究也表明 HIF-1 可通过 TGF- β 1 信号通路诱导 PAI-1 表达,并且这种表达在博来霉素致大鼠肺纤维化模型中早期就开始大量存在,说明低氧致肺纤维化早期就有纤溶系统的损害,并且这种损害伴随着肺纤维化的整个过程。本研究结果也发现:低氧处理第 3 d,大鼠肺泡间隔相对常氧环境下有不同程度增厚,7 d 后肺组织中 PAI-1 mRNA、蛋白及 BLAF 中 APC 蛋白表达量增加,后期随低氧作用时间的延长,肺泡间隔变化更显著,蛋白表达量逐渐增加,至低氧 21 d 时,出现了相对较高表达水平。故我们推测低氧作用下,大鼠体内经各种途径致纤溶及抗凝系统被抑制,使 PAI-1 表达上调、APC 表达下调,致大鼠肺泡间隔增厚。但本实验没有出现预期的组织纤维化,可能与低氧时间不够等有关。

TGF- β 1 是目前公认的致纤维化因子网络的“开关”,TGF- β 1/Smad 通路是致肺纤维化经典信号通路。我们前期实验已经检测了 TGF- β 1 蛋白,并发现其与 Smad4 蛋白表达呈正相关^[5]。而本研究结果发现低氧组中 PAI-1 mRNA 与 TGF- β 1 mRNA 表达水平呈正相关($r=0.913, P<0.05$),这与近年研究一致。近年研究^[14,15]发现 PAI-1 是 TGF- β 1 核内的靶基因之一,PAI-1 基因启动子中存在 TGF- β 1 反应元件,该元件含有与 Smads2/3 结合的结合位点,从而上调多种细胞 PAI-1 的表达^[16,17]。据此,我们推测上述低氧环境下,PAI-1 表达上调,纤溶系统抑制致肺泡结构变化可能是通过 TGF- β 1 信号转导途径。

灯盏花素是从菊科植物灯盏细辛中提取的黄酮成分,具有很强的抗氧化及扩张血管、改善微循环等作用,在心脑血管疾病中已应用多年。Zhang 等^[18]研究显示灯盏花素可改善缺血缺氧所致的损伤。本

研究结果发现灯盏花素组中 PAI-1 蛋白表达较单纯低氧组低($P<0.05$),而 BALF 中 APC 蛋白表达较单纯低氧组高($P<0.05$),且剂量高者表现更明显。灯盏花素通过这种调节肺组织凝血/纤溶系统之间平衡,改善低氧所致的肺泡间隔增厚。但灯盏花素是否具有抗纤维化作用有待进一步研究。

综上所述,低氧可通过上调 PAI-1 及下调 APC 表达,致大鼠凝血功能发生变化,致肺泡间隔增厚,其机制可能通过激活 TGF- β 1 信号转导途径。灯盏花素可通过抑制上述因子的表达减轻肺泡间隔增厚的程度。通过本实验,我们进一步推测低氧可能致肺纤维化,而肺间质的改变将进一步加重低氧,形成恶性循环,故若能在早期改善肺纤维化患者的低氧状态,或针对其凝血功能变化采用相关药物,可能对肺纤维化患者的病情发展有一定帮助。

参 考 文 献

- 1 Chambers RC, Scotton CJ. Coagulation cascade proteinases in lung injury and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*, 2012; 9(3): 96-101.
- 2 Chambers RC. Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention? *Brit J Pharmacol*, 2008; 153(1): 367-378.
- 3 Ruppert C, Markart P, Wygrecka M, *et al.* Role of coagulation and fibrinolysis in lung and renal fibrosis. *Hamostaseologie*, 2008; 28(1-2): 30-36.
- 4 高 艳, 谢 敏. 低氧不同时间对人胚肺成纤维细胞 RHO/RHO 激酶信号通路及 CTGF 表达的影响. *四川大学学报(医学版)*, 2010; 41(6): 946-950.
- 5 张 旭, 谢 敏. 低氧对大鼠肺组织结构的影响及其机制的探讨. *四川大学学报(医学版)*, 2012; 43(1): 1-5.
- 6 郑家群, 谢 敏. 灯盏细辛对低氧环境下肺成纤维细胞 I 型胶原、MMP1 和 TIMP1 表达的干预作用. *四川大学学报(医学版)*, 2012; 43(3): 325-330.
- 7 Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol*, 2012; 227(2): 493-507.
- 8 Izuhara Y, Takahashi S, Nangaku M, *et al.* Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 its mechanism and effectiveness on coagulation and fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008; 28(4): 672-677.
- 9 Monnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood*, 2007; 109(8): 3161-3172.
- 10 Suzuki K, Gabazza EC, Hayashi T, *et al.* Protective role of activated protein C in lung and airway remodeling. *Crit Care Med*, 2004; 32(5): 262-265.
- 11 Yasui H, Gabazza EC, Tamaki S, *et al.* Intratracheal administration of activated protein C inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001; 163(7): 1660-1668.

(下转第 622 页)

参 考 文 献

- 1 Benson RA, Patakas A, McQueenie R, *et al.* Arthritis in space and time: to boldly go! *FEBS Lett*, 2011; 585(23): 3640-3648.
 - 2 Cooles FA, Isaacs JD, Anderson AE. Treg cells in rheumatoid arthritis: an update. *Curr Rheumatol Rep*, 2013; 15(9): 352.
 - 3 Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, *et al.* FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*, 2010; 10(7): 490-500.
 - 4 Dominguez-Villar M, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Identification of T helper type 1-like, FoxP3⁺ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat Med*, 2011; 17(6): 673-675.
 - 5 Ayyoub M, Deknuydt F, Raimbaud I, *et al.* Human memory FOXP3⁺ Tregs secrete IL-17 *ex vivo* and constitutively express the T_H 17 lineage-specific transcription factor ROR γ t. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009; 106(21): 8635-8640.
 - 6 Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, *et al.* CD4⁺ CD25⁺ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*, 2005; 140(2): 360-367.
 - 7 Wang W, Shao S, Jiao Z, *et al.* The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 2012; 32(4): 887-893.
 - 8 van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, *et al.* CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum*, 2004; 50(9): 2775-2785.
 - 9 Holmen N, Lundgren A, Lundin S, *et al.* Functional CD4⁺ CD25 high regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. *Inflamm Bowel Dis*, 2006; 12(6): 447-456.
 - 10 Haufe S, Haug M, Schepp C, *et al.* Impaired suppression of synovial fluid CD4⁺ CD25⁻ T cells from patients with juvenile idiopathic arthritis by CD4⁺ CD25⁺ Treg cells. *Arthritis Rheum*, 2011; 63(10): 3153-3162.
 - 11 Nie H, Zheng Y, Li R, *et al.* Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis. *Nat Med*, 2013; 19(3): 322-328.
 - 12 林 辉, 周燕莉, 李 箭等. 关节液 Th17 细胞变化在类风湿关节炎免疫炎症中的作用. *四川大学学报(医学版)*, 2013; 44(6): 907-910.
 - 13 Venigalla RK, Tretter T, Krienke S, *et al.* Reduced CD4⁺, CD25⁻ T cell sensitivity to the suppressive function of CD4⁺, CD25^{high}, CD127⁻/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2008; 58(7): 2120-2130.
 - 14 Fantini MC, Rizzo A, Fina D, *et al.* Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression. *Gastroenterology*, 2009; 136(4): 1308-1316.
 - 15 Walter GJ, Evans HG, Menon B, *et al.* Interaction with activated monocytes enhances cytokine expression and suppressive activity of human CD4⁺ CD45ro⁺ CD25⁺ CD127low regulatory T cells. *Arthritis Rheum*, 2013; 65(3): 627-638.
 - 16 Duhon T, Duhon R, Lanzavecchia A, *et al.* Functionally distinct subsets of human FOXP3⁺ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood*, 2012; 119(19): 4430-4440.
 - 17 Prakken B, Wehrens E, van Wijk F. Quality or quantity? Unraveling the role of Treg cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2013; 65(3): 552-554.
- (2013 - 12 - 09 收稿, 2014 - 04 - 18 修回)
- 编辑 沈 进
-
- (上接第 571 页)
- 12 Kimura H, Torii K, Okada T, *et al.* Glucocorticoid enhances hypoxia and/or transformation growth factor-beta-induced plasminogen activator inhibitor-1 production in human proximal renal tubular cells. *Clin Exp Nephrol*, 2011; 15(1): 34-40.
 - 13 Ueno M, Maeno T, Nomura M, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α mediates TGF- β -induced PAI-1 production in alveolar macrophages in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011; 300(5): L740-L752.
 - 14 Muth M, Theophi Le K, Hussein K, *et al.* Hypoxia-induced down-regulation of microRNA-449a/b impairs control over targeted SERPINE1 (PAI-1) mRNA—a mechanism involved in SERPINE1 (PAI-1) overexpression. *J Transl Med*, 2011; 9: 24. doi: 10.1186/1479-5876-9-24.
 - 15 Kortlever RM, Nijwenning JH, Bernards R, *et al.* Transforming growth factor-beta requires its target plasminogen activator inhibitor-1 for cytostatic activity. *J Biol Chem*, 2008; 283(36): 24308-24313.
 - 16 Samarakoon R, Chitnis SS, Higgins SP, *et al.* Redox-induced Src kinase and caveolin-1 signaling in TGF-1-initiated SMAD2/3 activation and PAI-1 expression. *PLoS One*, 2011; 6(7): e22896.
 - 17 Pedroja BS, Kang LE, Imas AO, *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 regulates integrin α v β 3 expression and autocrine transforming growth factor beta signaling. *J Biol Chem*, 2009; 284(31): 20708-20717.
 - 18 张明艳, 范淑娟, 李利平等. 灯盏花注射液抗新生鼠缺氧缺血性脑损伤的作用及对 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响. *中国应用生理学杂志*, 2011; 27(2): 196-200.
- (2013 - 10 - 16 收稿, 2014 - 02 - 28 修回)
- 编辑 吕 熙